



7
Zey
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

CONSTRUCCION Y AISLAMIENTO DE MUTANTES
DE E. coli SENSIBLES A RADIACION.

T E S I S
PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A:
PEDRO CUAPIO PADILLA

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HIZIMOS EN
DE NUESTRA ESPERANZA

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. MATILDE BREÑA VALLE

MEXICO, D. F.

1995

FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE GENETICA
MICROBIANA, DEPARTAMENTO DE GENETICA DEL INSTITUTO NACIONAL
DE INVESTIGACIONES NUCLEARES (I.N.I.N), BAJO LA DIRECCION DE
LA M. EN C. MATILDE BREÑA VALLE

DEDICATORIAS

A LA MEMORIA DE MI PADRE. PEDRO CUAPIO CORTES

A quien debo tomo lo que soy, a quien nunca supo escatimar esfuerzos para sacarme adelante, a quien sacrifico toda su vida para convertirme en una persona de provecho y sirvió de guía en los momentos más difíciles, a quien con su cariño y amor hicieron posible que llegara este momento, a quien dedico con todo cariño y amor esta tesis. A ti padre.

A MI MADRE. BERTHA LILIA PADILLA

Por que su amor y cariño han sido base para que llegara este momento tan importante en mi vida, a quien ha formado a sus hijos llevándolos a ser personas de bien sacrificando gran parte de su vida, con todo el cariño y amor de tu hijo y como un agradecimiento te dedico esta tesis.

A MIS HERMANOS. FIDENCIO Y VANESSA

Cuyo cariño y amor sirvieron para llegar a este momento tan anhelado, con quienes he compartido tantos momentos de alegría y me han apoyado y han sido base en la elaboración de este trabajo, por todo lo que han significado en mi vida. Gracias

A SILVIA.

Cuyo amor y cariño son parte fundamental de mi vida, con quien e compartido muchos momentos de alegría inolvidables, ese apoyo que siempre me has brindado fue fundamental para terminar esta tesis y para continuar adelante, siempre estaré agradecido por todo lo que has hecho por mí. Mi amor y cariño siempre estarán contigo, compartiendo esos sentimientos tan lindos que siento por ti. Te amo.

A LA MEMORIA DE MI ABUELO. FIDENCIO CUAPIO SANCHEZ

Que siempre me brindo un cariño que me sirvió para seguir adelante e hizo que tuviera una niñez muy linda en Tlaxcala.

A LA MEMORIA DE MI ABUELA. AMALIA PADILLA MAGAÑA

Quien fue un segundo padre para mi, y que con su cariño, ternura y amor me sacaron adelante en el momento más triste de mi vida, a quien siempre estaré agradecido por tantas cosas que compartió conmigo y que me apoyo en momentos importantes de mi vida. Gracias Abuelita.

A MI ABUELA. PAZ CORTES

Por compartir tantos momentos lindos y hermosos de su vida, y quien hizo que tuviera una niñez muy especial y linda en Tlaxcala, con todo el cariño y amor. Gracias.

A LA MEMORIA DE JESUS LEMUS LOPEZ

Por compartir con mi abuelita toda una vida, y que siempre estará presente con nosotros.

A LA FAMILIA RAMOS MENDOZA.

Por todo el apoyo, confianza y amistad que me han brindado desde el día que los conocí, permitiendome ser parte, de una parte de sus vidas. Gracias

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la M. en C. Matilde Breña Valle, por la excelente dirección de tesis así como el apoyo, confianza y amistad que me ha brindado. Gracias.

A mis revisores de tesis : Dr. Mario Agustín Altamirano Lozano, M. en C. Carlos Bautista Reyes, M. en C. Enrique Mendieta Márquez y Q.B.P. Francisco Alvarado Pérez, por sus consejos y comentarios que sirvieron para enriquecer este trabajo.

Al M. en C. David Alcántara Díaz por su apoyo y comentarios que me brindó en este trabajo.

Al Biól. Jorge H. Serment Guerrero, por sus consejos, confianza, apoyo y amistad que me brindó durante toda la elaboración de este trabajo. Gracias.

Al Técnico-Biólogo Juan Antonio Correa Ortiz por su valiosa ayuda técnica y amistad que me brindó en este trabajo.

A la Sra. Guadalupe Martínez por su ayuda técnica en el trabajo.

A Ma. de Lourdes Olvera Velázquez por su amistad y apoyo que me brindó durante la elaboración de este trabajo.

A todo el personal del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, que de alguna manera colaboró en la realización de este trabajo.

Al M. en C. José Luis Gómez Márquez y Biól. Bertha Peña Mendoza por la amistad que me han brindado así como el apoyo en las instalaciones de Limnología y equipo de cómputo que me facilitó la elaboración de este trabajo.

A mis amigos de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza por la amistad durante toda la carrera.

INDICE

	pag.
RESUMEN.....	4
INTRODUCCION.....	5
1) HISTORIA DE LA RADIOACTIVIDAD.....	5
TIPOS DE RADIACION.....	5
RADIACION IONIZANTE.....	6
RADIACION IONIZANTE ELECTROMAGNETICA.....	6
RADIACION CORPUSCULAR.....	7
DOSIS.....	8
UNIDADES DE DOSIS.....	8
EFECTOS BIOLÓGICOS POR RADIACION IONIZANTE.....	9
2) ADN.....	10
ESTRUCTURA DE LA MOLECULA DE ADN.....	10
DAÑOS AL ADN.....	11
DAÑOS AL ADN POR RADIACION IONIZANTE.....	12
3) MECANISMOS DE CONSERVACION DE LA INFORMACION.....	14
MECANISMOS ESPECIFICOS DE ELIMINACION DEL DAÑO AL ADN.....	15
RESPUESTA ADAPTATIVA.....	15
FOTORREACTIVACION.....	15
MECANISMOS INESPECIFICOS DE ELIMINACION DEL DAÑO EN EL ADN.....	16
REPARACION POR ESCISION DE BASES (REB).....	16
REPARACION POR ESCISION DE NUCLEOTIDOS.....	16

MECANISMOS DE RESTITUCION O SUBSTITUCION DE LA INFORMACION.....	17
REPARACION POR RECOMBINACION.....	17
REPARACION DE DISPARIDADES EN EL ADN.....	18
MECANISMOS DE ELIMINACION O TOLERANCIA AL DAÑO.....	19
SISTEMA SOS.....	19
MECANISMOS DE PROTECCION Y ¿REPARACION? DEL DAÑO.....	21
RESPUESTA AL ESTRES OXIDATIVO.....	21
RESPUESTA AL CHOQUE TERMICO.....	21
4) ANTECEDENTES.....	23
5) HIPOTESIS.....	24
6) OBJETIVO GENERAL.....	24
OBJETIVOS PARTICULARES.....	24
7) METODOLOGIA.....	25
8) RESULTADOS.....	32
9) DISCUSION.....	38
10) CONCLUSIONES.....	41
11) BIBLIOGRAFIA.....	42
12) APENDICE.....	48

RESUMEN

La radiación ionizante produce lesiones en el ADN, principalmente rupturas de banda sencilla y doble, así como daños diversos en las bases. Estos daños pueden ser reparados o procesados por diversos mecanismos controlados por diferentes grupos de genes. Dentro de estos, los genes *rec* tienen un papel importante, especialmente en la reparación de las rupturas dobles.

Además de lo anterior los daños por radiación inducen la respuesta SOS, un conjunto de funciones de reparación y tolerancia al daño genético que también puede activarse cuando se interrumpe la duplicación del ADN. En ambos casos se inicia la expresión de aproximadamente 20 genes que participan en diferentes funciones celulares como, la filamentación, la duplicación estable, los mecanismos de reparación por escisión y por recombinación, la inducción de profagos y el aumento de las tasas de mutación espontánea e inducida. El grado de inducción SOS depende de la cantidad y la magnitud del daño en el genoma y puede cuantificarse por colorimetría mediante la técnica denominada cromoensoyo (Cromotest).

Utilizando esta prueba se determinó la respuesta SOS producida por la radiación ionizante en cepas de *Escherichia coli* deficientes en genes de recombinación (*recJ* y *recO*) y de protección contra oxidación (*oxyR*), para establecer su participación en la protección o reparación del ADN y por consiguiente en la sensibilidad a la radiación.

Los resultados obtenidos en las cepas construidas por ese propósito, indican que los genes *recJ* y *recO* tienen un papel importante tanto en la supervivencia celular al daño por radiación ionizante, como en la generación de la señal de inducción necesarias para que se de la respuesta SOS. En cambio, contrariamente a lo esperado, la deficiencia en *oxyR* no parece tener gran relevancia en la supervivencia a la radiación.

En base a lo anterior se plantea un posible modelo cuya propuesta es que el producto del gen *recJ* colabora con otras exonucleasas como *recBCD* en la degradación de las rupturas dobles transformandolas en regiones de una sola banda y que el de *recO* desplaza a la proteína SSB, permitiendo que el iniciador de SOS, RecA, se adhiera a esas regiones para degradar al represor LexA y pueda así comenzar la transcripción de los demás genes SOS.

INTRODUCCION

1) HISTORIA DE LA RADIOACTIVIDAD.

Los hallazgos de Roentgen sobre los rayos X, de Becquerel sobre el uranio y Pierre y Maria Curie con el descubrimiento del polonio y radio, sentaron las bases para el conocimiento de la radioactividad. (Casarett, 1968).

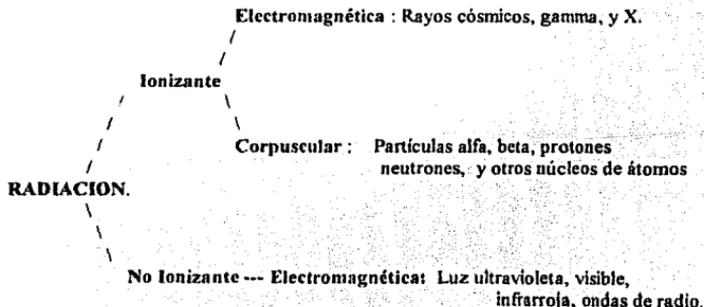
En 1895 Roentgen estudió las descargas eléctricas en un sistema de rayos catódicos y notó la producción de fluorescencia en algunas placas de bario adyacentes. Notó que estos rayos viajan en línea recta y que atravesaban algunos materiales y otros no, descubriendo los rayos X. (Casarett, 1968).

Posteriormente, en 1896 Henry Becquerel, estudiando la fluorescencia de sales de uranio expuestas a rayos solares observó que dichos cristales ennegrecían una placa fotográfica. Más tarde guardó una pequeña cantidad de sales en un cajón, sobre otra placa fotográfica y al revelarla después observó que se ennegreció la zona en donde se encontraba la muestra. Pierre y Marie Curie en 1898 reunieron los resultados de Becquerel y llegaron a la conclusión que los rayos de uranio eran característicos para este elemento, descubriendo la radioactividad natural. (Casarett, 1968).

La radioactividad se define como la desintegración espontánea de los átomos de ciertos elementos, con la emisión simultánea de radiación electromagnética o de partículas (Casarett, 1968).

TIPOS DE RADIACION

El término radiación indica un fenómeno físico en el cual la energía atraviesa el espacio. La radiación juega un importante papel en los procesos biológicos y en la evolución de la vida en el planeta. De acuerdo a su energía la radiación puede ser :



Radiación Ionizante.

Las radiaciones ionizantes son fotones o partículas con energía de unos pocos Kev* a cientos de Mev**, lo que es suficiente para provocar la salida de electrones orbitales de los átomos del material que atraviesa.

Radiación Ionizante Electromagnética.

La radiación ionizante electromagnética consiste de paquetes o cuantos que contienen y transportan una cantidad discreta de energía, que no poseen masa en reposo ni carga e independientemente de su energía, se mueven en el vacío con la velocidad de la luz (3×10^8 m/seg). (Casarett, 1968).

La radiación gama se produce cuando el núcleo atómico libera energía para estabilizarse, a diferencia de los rayos X que se producen artificialmente cuando partículas cargadas inciden sobre un blanco apropiado. La radiación gama y los rayos X se presentan entre longitudes de onda de 10^{-11} a 10^{-7} cm. (Figura 1) (Casarett, 1968).

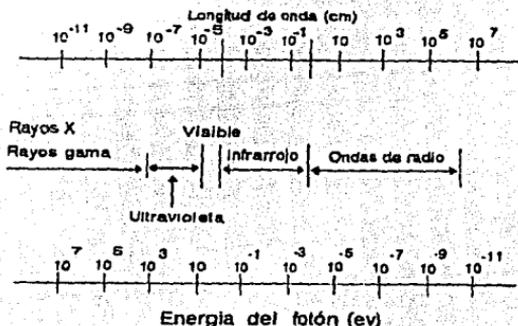


Figura 1. Longitudes de onda y de energía de la radiación electromagnética (Casarett, 1968).

Según la energía de la radiación y el tipo de material que atraviesa, se pueden producir los siguientes efectos :

- * Kiloelectronvoltios (Kev)
- ** Megaelectronvoltios (Mev)

Efecto fotoeléctrico. En este caso, toda la energía del rayo o fotón se transfiere a un electrón, sacándolo de su órbita.

Efecto Compton se presenta con fotones de mayor energía de tal manera que parte de ésta se pierde al ser expulsado un electrón y el resto se disipa en un fotón secundario, con longitud de onda mayor.

La **producción de pares** ocurre con fotones de alta energía que al interactuar con el núcleo, desaparecen expulsando simultáneamente un positrón y un electrón. (Figura 2)

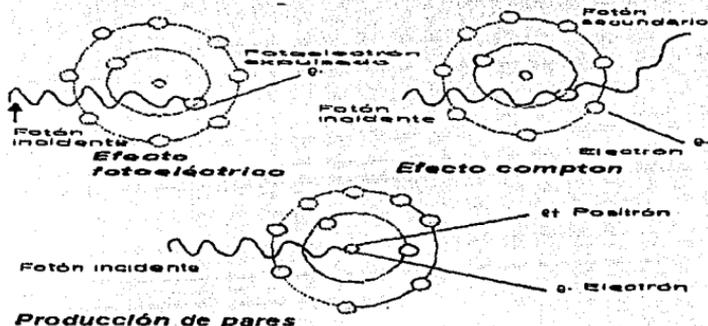


Figura 2. Ionización del material por radiación electromagnética (Casaret , 1968).

Radiación Corpuscular.

Este tipo de radiación posee masa y energía y aunque su poder de penetración es relativamente pequeño, produce en cambio gran cantidad de ionizaciones al interactuar con la materia.

Las partículas alfa son núcleos de helio constituidos por dos neutrones y dos protones, lo que les da una doble carga de carácter positivo (2^+). Esto propicia una atracción electrostática muy marcada hacia los electrones exteriores de los átomos a los que se acercan, provocando entonces que se exciten y cambien de orbital. A lo largo de su trayectoria, la partícula alfa va perdiendo velocidad, al tiempo que aumenta su poder de ionización ya que cada vez va cediendo mayor energía a la materia hasta perderla totalmente. Esto se observa en la curva de Bragg. (Figura 3)

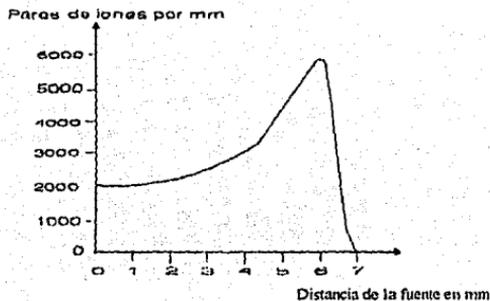


Figura 3. Curva de Bragg (Casaret, 1968).

La radiación beta consiste de partículas emitidas por el núcleo que según su carga se denominan positrones (carga positiva) ó negatrones (carga negativa). Su velocidad, similar a la de la luz, dificulta la interacción con los electrones orbitales de los átomos a los que se aproximan, por lo que su penetración en la materia es mayor (Casaret, 1968).

DOSIS

La importancia de la radiación radica en la energía que lleva y así, la dosis se define como la cantidad de energía que se absorbe o deposita al pasar la radiación por un material.

UNIDADES DE DOSIS

Para estudiar y entender los efectos de la radiación ionizante en los sistemas biológicos, se han propuesto distintas unidades de radiación y se han definido términos necesarios para explicar los efectos de ésta sobre la materia viva.

Curie (Ci). Es una medida de actividad, que indica la tasa de decaimiento de un elemento radiactivo y su equivalencia es de 3.7×10^{10} desintegraciones por minuto. Esta unidad ya ha sido sustituida por el becquerel (Bq) que se define como el número de transformaciones nucleares que ocurren en una cantidad determinada de material por unidad de tiempo. Equivale a 3.7×10^{10} Bq por Ci. (Casaret, 1968).

Roentgen (R). Es una unidad de exposición y se refiere a la cantidad de iones producidos en el aire por la radiación electromagnética. Se define como la exposición a rayos gamma o X que producen una unidad de electricidad de cualquier signo en 1 cm de aire seco. Esta unidad sólo se utiliza para la radiación electromagnética. (Casarett, 1968).

Rad. Esta unidad determina la cantidad de energía que absorbe el material sobre el que incide la radiación y equivale a 100 ergios de energía disipados en 1 g del material irradiado, sin importar el tipo de radiación. En la actualidad se substituye al rad por el gray (Gy) que se define como la absorción en 1 Kg de material, de 1 joule de energía y tiene una equivalencia de 100 rads. (Casarett, 1968).

Rem. Es una unidad de dosis/equivalencia, ya que una misma dosis de rads tiene distintos efectos biológicos según el tipo de radiación. En protección radiológica se toma la dosis absorbida en rads, multiplicada por el LET y por el factor de calidad, específico para cada tipo de radiación. Esta unidad ya se substituyó por el sievert (Sv) que se define como la cantidad de energía necesaria para producir en 0.01 g de material, el mismo grado de daño que una radiación de referencia y equivale a 100 rems. (Casarett, 1968).

LET. Es la transferencia lineal de energía y se refiere al promedio de energía depositada por la radiación en 10^3 nm. (Casarett, 1968).

EFFECTOS BIOLÓGICOS POR RADIACION IONIZANTE

Al penetrar la radiación en la materia interacciona con ésta, produciendo en última instancia fenómenos de ionización y de excitación atómica o molecular, que producen la ruptura de enlaces químicos alterando las especies químicas presentes y aún produciendo otras nuevas. De lo anterior resultan cambios que afectan a las estructuras celulares. El efecto que tiene la radiación ionizante en el organismo puede ser directo ó indirecto, el directo se refiere al daño que provoca la radiación al incidir sobre la materia viva. El indirecto es causado por los productos de la radiólisis del agua, como son los iones (H^+ , OH^- , H_2) y los peróxidos (H_2O_2) que interactúan con el ácido desoxirribonucleico (ADN) y otras moléculas (Casarett, 1968; Hurts y Nasim, 1984).

En consecuencia la radiación puede afectar a los componentes celulares así como al ADN y son las lesiones en éste las que, si permanecen, tienen consecuencias no sólo en la célula sino en sus descendientes. Al dañarse el ADN se pueden producir tres eventos finales: recuperación total al daño, mutaciones y muerte celular. De esta manera se debe de mantener íntegra la estructura de la molécula, porque en ella se encuentra la información genética que determina las características de la especie y es necesario que se duplique fielmente.

2) ADN

Estructura de la molécula de ADN.

En la molécula del ADN se encuentra la información que determina las características metabólicas y estructurales de los seres vivos. El ADN consta de dos largas cadenas complementarias en posición antiparalela y cada una de ellas es a su vez un polímero constituido por cuatro unidades diferentes, los nucleótidos. Estos nucleótidos están formados por una base nitrogenada, un azúcar que es β -D-2-desoxirribosa y un grupo fosfato, unidos estos dos últimos por enlaces fosfodiéster. (Howard y Flanders, 1981).

Existen cuatro tipos diferentes de bases nitrogenadas : 2 purinas adenina (A) y guanina (G) y 2 pirimidinas timina (T) y citosina (C). (Figura 4) Las bases de una y otra cadena se unen entre sí en forma específica mediante puentes de hidrógeno, así la adenina se une con la timina y la guanina con la citosina. Esta unión es fundamental para la transcripción, duplicación y recombinación del ADN (Howard y Flanders, 1981; Klug y Cummings, 1991). (Figura 4)

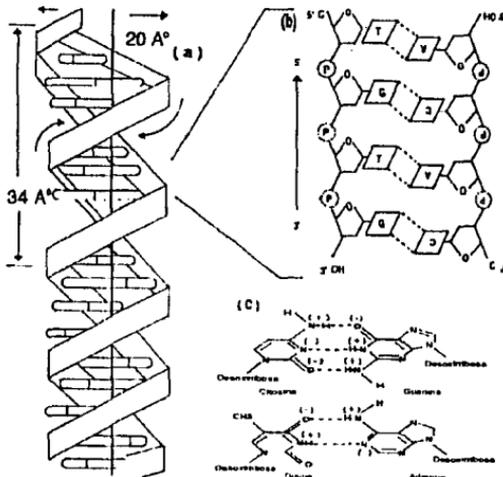


Figura 4. Representación esquemática de la doble hélice de ADN. (a) Doble hélice de ADN. (b) Representación antiparalela de la doble hélice. (c) Puentes de hidrógeno entre nucleótidos (Klug y Cummings, 1991).

La información del ADN está determinada por las secuencias de bases a lo largo de las cadenas, formando palabras de tres letras, denominadas codón. Cada uno corresponde a alguno de los diferentes aminoácidos que constituyen las proteínas, producto de la transducción del mensaje genético (Lehninger, 1980)

No obstante como puede haber 64 combinaciones diferentes de bases y solamente hay 20 aminoácidos existen por lo menos 2 codones diferentes para cada uno. A esto se le denomina código o clave degenerada o redundante. (Lehninger, 1980)

Daños al ADN.

El ADN es una macromolécula muy estable con alto grado de fidelidad especialmente durante la duplicación. Sin embargo por su conformación, está propensa a cambios originados por una gran variedad de agentes físicos, químicos y biológicos del ambiente, que modifican la información genética. (Kushner, 1987).

Por ejemplo, la radiación de longitud de onda cercana a los 260 nm provoca daños como la unión de dos bases pirimidícas (timinas) adyacentes en la misma cadena, a través de la saturación de los dobles enlaces entre los carbonos 5 y 6, dando por resultado una estructura en forma de anillo de cuatro carbonos, que se conoce como dimero de pirimidina (Friedberg, 1985; Kushner, 1987; Klug y Cummings, 1991). (Figura 5)

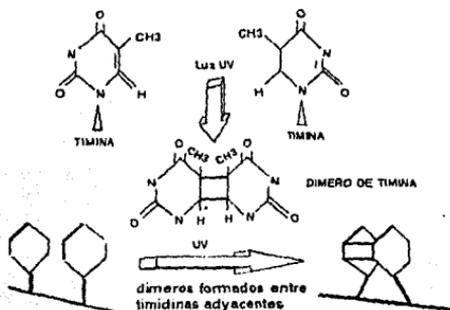


Figura 5. Formación de dímeros de timina inducidos por luz UV (Klug y Cummings, 1991).

Daños al ADN por radiación ionizante.

Como se mencionó anteriormente, los efectos de la radiación ionizante sobre el organismo, pueden ser directos e indirectos, pero en ambos casos consisten en daños en las bases y ruptura en los enlaces glucosídico y fosfodiéster. (Hurts y Nasim, 1984).

Aproximadamente el 20 % de los radicales OH, producto de la radiólisis del agua, reaccionan con el ADN, produciendo rupturas en los enlaces fosfodiéster que se traducen en interrupciones en la continuidad de una o ambas cadenas de la doble hélice, (Figura 6) (Hurts y Nasim, 1984).

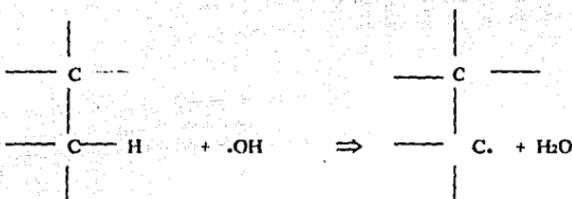


Figura 6. Reacción de hidrólisis. Los radicales OH reaccionan con cualquier carbono de la desoxirribosa, sustrayendo un átomo de hidrógeno para formar una molécula de agua (Hurts y Nasim, 1984).

Las rupturas de dos bandas se producen al romperse simultáneamente sitios opuestos en ambas bandas y son menos frecuentes que las rupturas de una sola banda. La frecuencia de rupturas dobles en relación con las sencillas es menor al 5% a radiaciones de bajo LET, y se incrementa a medida que aumenta el LET (Hurts y Nasim, 1984).

Los daños a las bases se presentan al reaccionar los radicales hidroxilo, producto de la radiólisis del agua con las bases. (Hurts y Nasim, 1984). (Figura 7)

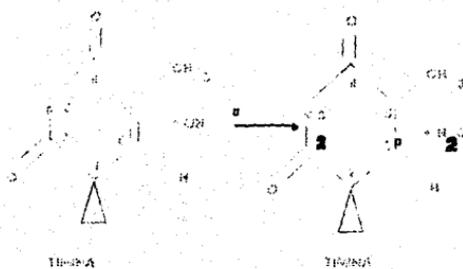
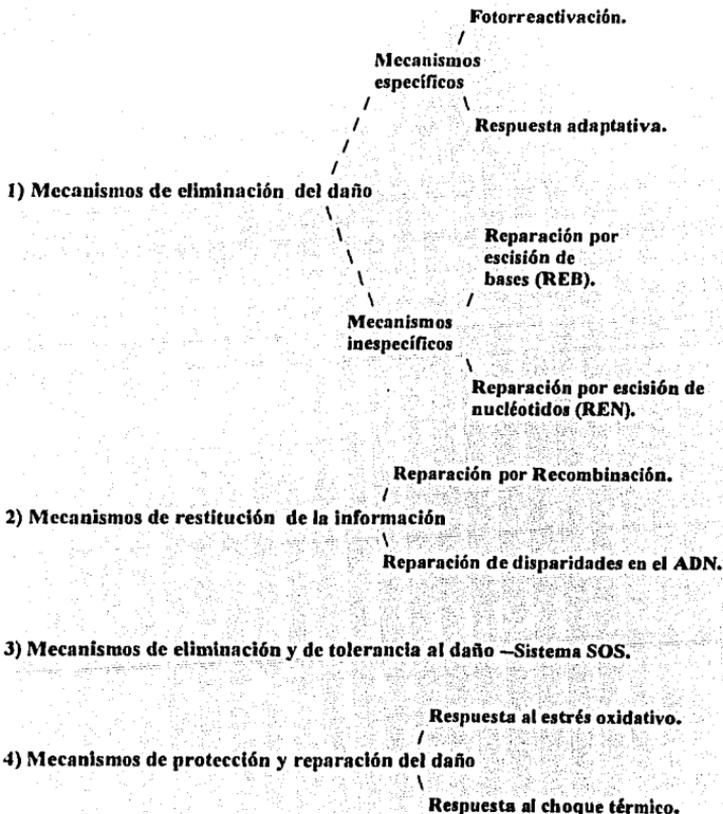


Figura 7. Daños a las bases. Los grupos OH atacan a los enlaces 5' \rightleftharpoons 6' de las bases (Hurts y Nasim , 1984).

3) MECANISMOS DE CONSERVACION DE LA INFORMACION

Dado que el ADN contiene la información genética, es vital que los organismos tengan la posibilidad de reparar los daños que se producen en esta molécula y así mantenerla intacta hasta donde sea posible. Para esto se cuenta con diversos sistemas de protección y reparación (Sancar y Sancar, 1988), que pueden clasificarse en :



Mecanismos específicos de eliminación del daño al ADN

Este tipo de mecanismos de reparación son específicos para un determinado daño en el ADN, ya que reconocen solamente ciertas lesiones muy particulares. Dentro de estos mecanismos se tiene a la respuesta adaptativa y a la fotorreactivación. (Allan y Garner, 1994),

Respuesta Adaptativa

La respuesta adaptativa es un mecanismo que actúa sobre la O-6-alquilguanina, que es uno de los productos originados por el tratamiento de la célula con agentes alquilantes, como la metil-nitro-nitrosoguanidina (MNNG). La enzima que repara este tipo de lesiones es la O-6-alquilguanina-alquil-transferasa (ATasa), que reconoce como sustratos a la O-6-etilguanina o a la O-6 metilguanina, y transfiere el grupo alquilo en la posición O6 de la guanina a la cisteína que forman parte de sí misma, dando como resultado la eliminación del daño. Una vez captado el grupo alquilo, se inactiva la enzima por lo que cada molécula de alquilguanina requiere de una molécula de O-6-alquilguanina-alquil-transferasa. (Friedberg, 1985; Allan y Garner, 1994).

Fotorreactivación

La fotorreactivación es llevada a cabo por una enzima, la ADN-fotoliasa, que elimina los dímeros de pirimidina producidos por la luz UV de onda corta, por ruptura del anillo ciclobutano con la absorción, de un fotón de longitud de onda de 260 nm, correspondiente a la región azul del espectro visible (Paterson y Gentner, 1984; Myles y Sancar, 1989). Esto ocurre en dos etapas. Primero se une la enzima al sitio donde se encuentra un dímero y después, al incidir la luz de longitud de onda adecuada, se produce la ruptura del anillo de cuatro carbonos, quedando las dos pirimidinas originales. (Figura 8) (Friedberg, 1985; Myles y Sancar, 1989; Klug y Cummings, 1991; Allan y Garner, 1994).

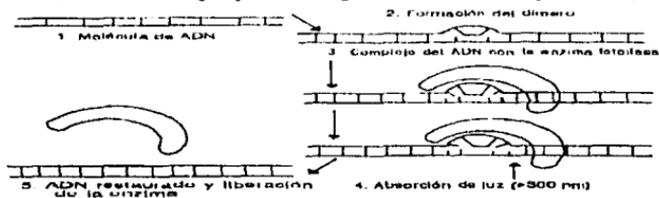


Figura 8. Reparación fotoenzimática (Friedberg, 1985).

Mecanismos inespecíficos de eliminación del daño en el ADN

Este tipo de mecanismos se clasifican como inespecíficos ya que pueden intervenir en la reparación de diversos tipos de daños mediante escisión y eliminación del tramo de ADN alterado y posterior restitución del mismo a su forma original. Se conocen dos tipos de reparación por escisión, eliminación de bases (REB) y eliminación de nucleótidos (REN).

Reparación por Escisión de Bases (REB)

Este proceso se efectúa con la participación de glucosidasas de ADN y endonucleasas AP. El primer paso consiste en la remoción de la base dañada a través de la acción de una glucosidasa, que corta la unión N-glucosídica entre azúcar y base, originando un sitio apurínico o apirimidínico (sitio AP), según la base que se trate. Los sitios AP, que también pueden formarse por la hidrólisis espontánea de la ligadura N-glucosídica, son reconocidos por enzimas específicas (endonucleasas AP) que cortan las uniones fosfodiéster a ambos lados dejando un espacio que puede ser a su vez, extendido por acción de alguna exonucleasa celular. De esta manera se crea un hueco que posteriormente se rellena por acción de la polimerasa I del ADN, que reemplaza a los nucleótidos eliminados tomando como modelo a la cadena complementaria. Por último, la ligasa de ADN cataliza la formación de los enlaces fosfodiéster tanto del lado 3' como del 5' de la región substituida. (Kushner, 1987; Myles y Sancar, 1989; Allan y Garner, 1994)

Reparación por Escisión de nucleótidos (REN)

El mecanismo es muy similar al anterior, sólo que en este caso no intervienen glucosidasas sino un complejo enzimático que reconoce la lesión, muy probablemente por las deformaciones que a consecuencia de ésta se producen en la estructura tridimensional del ADN.

La reacción se efectúa en varias etapas y está catalizada por el complejo enzimático UvrABC. En la primera parte, un dímero de la enzima UvrA, se une de manera inespecífica al ADN dañado formando un complejo inestable. En seguida se une la proteína UvrB, incrementando la estabilidad del complejo ADN-UvrA y la especificidad por el sitio dañado. Una vez localizado el daño, interviene una tercera proteína, UvrC que al unirse al resto rompe la octava ligadura fosfodiéster en el lado 5' del sitio dañado y la cuarta o quinta del lado 3'. Este complejo de tres proteínas, UvrA, UvrB y UvrC permanece unido al ADN hasta que por acción de la helicasa II del ADN (UvrD) se libera junto con el oligonucleótido que incluye la región dañada (Figura 9) (Friedberg, 1985; Sancar y Sancar, 1988; Myles y Sancar, 1989; Allan y Garner, 1994). El espacio libre que queda se llena en forma similar a la descrita para REB.

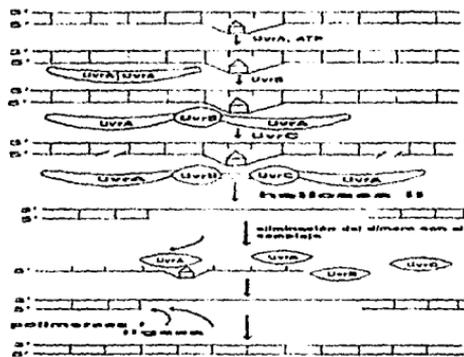


Figura 9. Reparación por escisión de nucleótidos (Kushner, 1987).

Mecanismos de restitución o sustitución de la información

Reparación por Recombinación.

La recombinación es el proceso por el cual se intercambian fragmentos de ADN entre cromosomas homólogos (Weinstock, 1987). La recombinación se inicia cuando por acción de alguna helicasa como RecBCD, la molécula de ADN se abre y empiezan a separarse las dos cadenas. Al llegar a un sitio específico se corta una de las bandas por acción exonucleolítica de la misma enzima, dejando así un extremo 3'-OH libre. Este continúa alargándose a medida que se separan las dos hebras y con la ayuda de otras enzimas específicas (RecA ?), se traslada hasta donde se encuentra la otra copia de ADN, uniéndose entonces con la secuencia homóloga por la acción de la ligasa del ADN. De este modo cada molécula queda con un tramo de la otra. El proceso depende de la actividad de la proteína RecA (Fig.10) (Howard y Flanders, 1981; Stahl, 1987; Kushner, 1987; Sancar y Sancar, 1988; Myles y Sancar, 1989; West, 1992). Hay cierto tipo de lesiones que inhiben o bloquean la duplicación de ADN (por ejemplo los dímeros de pirimidina) y cuando la polimerasa del ADN encuentra este tipo de anomalías en la hebra que sirve de molde, deja de insertar nucleótidos y continúa con su labor más adelante, quedando un hueco justo enfrente de donde se localiza el daño; este tipo de daños pueden ser reparados por recombinación. (Figura 10)

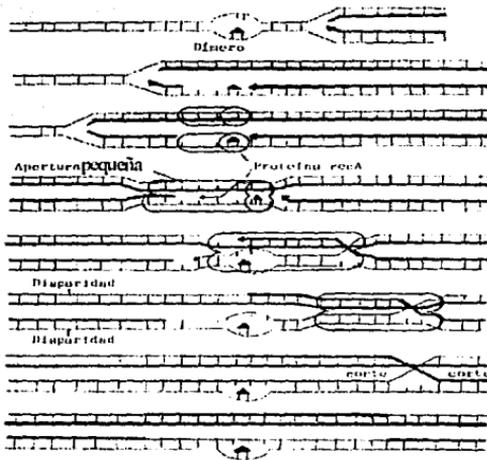


Figura 10. Mecanismo de reparación por recombinación (Friedberg, 1985).

Reparación de Disparidades en el ADN

Es un sistema de reparación que elimina los errores que pueden ocurrir durante la síntesis de ADN. (Modrich, 1991). El sistema está activo durante el metabolismo normal de la célula, eliminando las disparidades G-T, A-C, A-A y G-G, para ello se encuentran implicados los productos de los genes *MutH*, *MutL*, *MutS* (Modrich, 1991).

MutH se une a la secuencia GATC que se encuentra metilada y va a proporcionar el sustrato para las proteínas *MutS* y *MutL*, *MutS* va a proporcionar estabilidad al ADN, promoviendo la formación de una estructura de asa en forma de alfa (α -shaped loop) y *MutL* al parecer participa en la señal de transducción entre *MutH* y *MutS* (Myles y Sancar, 1989; Modrich, 1991).

Mecanismos de eliminación y tolerancia al daño

Sistema SOS.

En 1965, investigadores de la Universidad de California que realizaban estudios de recombinación genética, aislaron mutantes de *Escherichia coli* cuyo ADN no efectuaba la recombinación y atribuyeron la falla a un gen al que llamaron *recA*. Más adelante observaron que en las células lisogénicas, defectuosas en *recA*, no se inducía el fago lambda aún cuando se expusieran a la luz UV, concluyendo que dicho gen era también necesario para la activación de algunos profagos (Howard-Flanders, 1984).

Años después se llegó al conocimiento de que los mismos mecanismos que inducían a los fagos en células lisogénicas irradiadas, estimulaban la síntesis de enzimas involucradas en la reparación del ADN e interrumpían la duplicación y división celular, de tal modo que la célula se alargaba en vez de dividirse; incrementaban la tasa de mutación y estimulaban la síntesis de una proteína conocida en aquel entonces como la proteína X. Parecían ser reacciones a una situación de emergencia, así que en 1975 Radman les dió el nombre de "respuesta SOS" para destacar el hecho de que sólo se activaba cuando el daño en el ADN era tal que, al bloquear temporalmente la duplicación generaban esa situación de emergencia en la célula cuya finalidad era la de incrementar la probabilidad de sobrevivir al daño.

El sistema SOS se encuentra conformado por aproximadamente 20 genes involucrados en diferentes procesos celulares. La inducción de este sistema está controlada por los productos de los genes *recA* y *lexA* de los que a su vez depende la transcripción del resto, incluyendo la de ellos mismos.

En condiciones normales el producto de *lexA*, la proteína LexA actúa como represor de todos los genes SOS, al permanecer unida a una secuencia común a todos ellos, los operadores SOS (Walker, 1987). De esta manera inhibe casi totalmente la transcripción, sin embargo, algunos genes se expresan en forma leve y los productos alcanzan niveles importantes para la célula (Walker, 1987).

Las regiones del ADN donde falta uno o más nucleótidos, es decir tramos de una sola banda al parecer son suficientes para activar a la proteína RecA. Esta adquiere además de sus funciones normales de recombinación la de proteasa, actuando como cofactor en la digestión del represor LexA.

La degradación de LexA permite que se exprese el resto de los genes y que las funciones SOS comiencen a manifestarse. Entre los genes activados están *lexA* y *recA* (reguladores del sistema): *sulA* y *sulB*, que inhiben la división celular; *uvrA*, *uvrB*, *uvrC*, *uvrD* y *recN* responsables de la reparación, éste último participa en la reparación de rupturas dobles; *umu D* y *C* que permiten la síntesis de ADN, a pesar de las lesiones, lo que conduce a un aumento en la frecuencia de mutación. Además hay otros genes llamados *din* (damage inducible) cuyas funciones todavía no se conocen (Kenyon, 1983; Walker, 1987; Devoret, 1992). Una vez reparado el daño se pierde la señal de inducción, RecA regresa a

sus funciones normales, aumentan los niveles de LexA y se reprime todo el sistema. (Figura 11) (Walker, 1987; Myles y Sancar, 1989; Devoret, 1992).

La consecuencia final de SOS es una mayor tolerancia al daño, aunada sin embargo, a un aumento general en la frecuencia de mutaciones pero que incrementa la probabilidad de supervivencia celular.

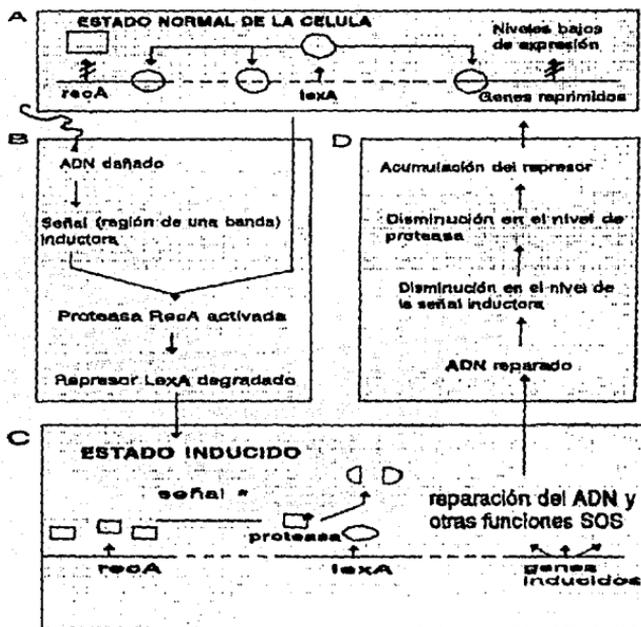


Figura 11. MODELO DEL SISTEMA REGULADOR SOS.

A) Estado en crecimiento normal de las células, B) Transición al estado inducido, C) Estado inducido, D) Transición al estado normal de crecimiento (Little y Mount, 1982).

Mecanismos de protección y ¿reparación? del daño

Respuesta al Estrés Oxidativo.

Los organismos que utilizan el oxígeno se exponen a los productos que resultan de las reacciones de este elemento durante los procesos normales de respiración. Estos pueden ser peróxidos principalmente (H_2O_2) y diversos radicales como el ion hidroxilo (OH). Estos pueden a su vez oxidar a diversos componentes del ADN y de la membrana celular, así como a las proteínas y los lípidos (Christman et al., 1985; Demple, 1991). El estrés oxidativo se define como la condición en la cual el equilibrio entre la producción de especies que reaccionan con el O_2 y las defensas antioxidantes se altera, produciéndose modificaciones o daños en las funciones celulares (Lafleur y Retel, 1993).

Para hacer frente a esta situación, los organismos cuentan con sistemas que contrarrestan ese desequilibrio. En algunas bacterias como *E. coli* o *Salmonella typhimurium* se observa una respuesta que se traduce en mayor resistencia a diferentes dosis de peróxidos, acompañada de un aumento en los niveles de diversas proteínas y enzimas (Christman et al., 1985; Goerlich et al., 1989). El sistema más conocido es el controlado por el gen *oxyR* en *S. typhimurium* y *E. coli* que regula en forma positiva la transcripción de 9 proteínas (peroxidasa, catalasa, etc) y protege a la célula contra radicales oxidantes (Christman et al., 1985; Storz et al., 1990).

Respuesta al Choque Térmico.

Es el mecanismo que protege a la célula contra los daños por un aumento excesivo en la temperatura. En el hombre y otros organismos se ha observado que al haber un ascenso en la temperatura, se produce un aumento en la síntesis de proteínas. En *E. coli* existe un importante mecanismo de protección (Yura et al., 1993), la respuesta al choque térmico, controlada por el gen *htrP* que es un regulador positivo de 19 genes como *rpoD*, que codifica para la subunidad sigma (π) de la polimerasa del ARN (Christman et al., 1985; Masaaki et al., 1994).

La inducción de este proceso es inmediata al aumento en la temperatura y tarda desde unos cuantos segundos hasta 5 minutos, para empezar a declinar aproximadamente a los 20-30 minutos (Yura et al., 1993). Entre las proteínas que participan en la tolerancia a los aumentos de temperatura están, Hsp100, Lon, Hsp70, ClpP, y GrpE, cuyas diferentes actividades son vitales para el mantenimiento de la bacteria. La Hsp100 permite tolerar temperaturas extremas, Hsp70 es una proteína inducible al calor, que se requiere para crecer y moderar las altas temperaturas. Lon presenta actividad de proteasa dependiente de ATP que degrada a determinadas proteínas como Sula, ClpP participa en la lisis de proteínas anormales que se forman por el estrés (Parsell y Lindquist, 1993; Yura et al., 1993).

De los sistemas antes descritos, los dos últimos más que de reparación, son de protección y su acción abarca no solamente el genoma sino diversas estructuras celulares. Algunos procesos como la fotorreactivación, SOS o la respuesta adaptativa probablemente sólo actúen cuando hay daño genético, mientras que otros como la reparación de regiones dispares intervienen tanto durante la duplicación del ADN corrigiendo equivocaciones de las polimerasas como disparidades (heteroduplexes) que aparezcan al terminar el proceso de reparación por recombinación. El que uno u otro actúe en un momento dado depende de las condiciones fisiológicas de la célula pero también del tipo de lesión presente en el genoma. Tal es el caso de los dímeros de pirimidina que son eliminados por la reparación por escisión de nucleótidos o las rupturas en la doble banda del ADN que sólo por recombinación pueden corregirse.

4) ANTECEDENTES

Utilizando el bacteriófago μ Quillardet y Hofnung (1985) fusionaron el gen *lacZ* dentro de *suIA*, perteneciente a la vía SOS de *E. coli* de tal manera que el producto del gen fusionado, la enzima β -galactosidasa, se sintetizaba entonces junto con los de demás productos de los genes SOS.

La actividad de esta enzima se determina agregando un sustrato específico, que al ser hidrolizado da un color amarillo cuya intensidad se mide por espectrofotometría a 420 nm de longitud de onda. Además de *lacZ* los investigadores introdujeron cambios en el gen de la fosfatasa alcalina volviéndolo constitutivo para que de esta manera sirviera como indicador de síntesis de proteínas en general y de supervivencia. La técnica, a la que se le denominó Cromoensayo (Chromotest), es una prueba colorimétrica sensible al efecto genotóxico de diversos agentes (Quillardet y Hofnung, 1985).

Posteriormente, éste y otros grupos de trabajo probaron que el cromosoma detectaba también el daño genético provocado por diversos tipos de radiación ionizante (Quillardet *et al.*, 1989; Kozubek *et al.*, 1990) especialmente a dosis altas. Al mismo tiempo Breña *et al.* (1989) encontraron que a dosis menores (2 Gy de radiación gama) también se lograba inducir el sistema SOS en forma significativa.

Con el propósito de sensibilizar el método y así poder detectar dosis de radiación todavía más bajas, se construyeron otras cepas con sensibilidad a dosis hasta de 1 Gy. (Breña y Serment 1991, 1992 y Serment, 1992). En la actualidad se tienen algunas cepas con defectos en diferentes genes como IN28 (*recN, oxyR*), IN99 (*recB, oxyR*), OG100 (*oxyR*), PQ37 (*uvrA*). Estas diferencias aparte de sensibilizar al sistema, permiten además estudiar la importancia de diversos genes de reparación y recombinación en la respuesta celular a la radiación.

Continuando con esta línea de trabajo, en el presente estudio se construyeron cepas deficientes en los genes *recO*, *recJ* y *oxyR* para determinar su sensibilidad al efecto letal de la radiación gama así como el grado de inducción de las funciones SOS y establecer así su posible participación en la reparación de ADN dañado por la radiación ionizante.

HIPOTESIS

Los genes de recombinación *recJ* y *recO* intervienen en procesos de recombinación y de reparación del ADN, mientras que *oxyR* regula la actividad de genes que protegen al genoma contra los daños producidos por oxidaciones. Al introducir defectos en los genes mencionados se espera obtener cepas con sensibilidad a radiación gamma distinta de la que tienen las cepas silvestres. De ser así, esto ayudará a determinar la importancia de dichos genes en la respuesta celular al daño por radiación.

OBJETIVO GENERAL

Construir y aislar cepas de *E. coli* sensibles a radiación ionizante.

OBJETIVOS PARTICULARES

Determinar la sensibilidad a radiación gamma de cepas con deficiencias en los genes *recO*, *recJ* y *oxyR*.

Determinar la participación de estos genes en la supervivencia celular.

Determinar la influencia de estos genes en la inducción del sistema SOS a diversas dosis de radiación gamma.

De ser posible, plantear un modelo en cuanto a la participación de dichos genes en la reparación del daño ocasionado al ADN por la radiación ionizante.

METODOLOGIA

Las cepas utilizadas a lo largo del trabajo se muestran en la tabla 1. Sólo se especifican los genes defectuosos en reparación y recombinación, así como la fusión *lacZ* que permite medir la actividad SOS.

TABLA 1		
CEPAS DE <i>E. coli</i>	MARCADORES RELEVANTES	PROCEDENCIA
1) C600	<i>w</i>	R. Appleyard. Pasadena
2) PQ30	<i>sulA::mud (AplacZ) *</i> , **	P. Quillardet. Paris
3) PQ37	igual a PQ30 pero <i>uvrA</i> , <i>rfa</i>	P. Quillardet. Paris
4) OG100	igual a PQ30 pero <i>oxyR</i> , <i>btuB</i>	P. Quillardet. Paris
5) IN28	igual a OG100 pero <i>recN::Tn10</i> **	J. Serment. I.N.I.N. México
6) IN99	igual a OG100 pero <i>recB::Tn10</i> **	J. Serment. I.N.I.N. México
7) RDK1541	<i>recO::Tn5</i>	R. Kolodner. Boston
8) RDK1450	<i>recJ::Tn10</i>	R. Kolodner. Boston
9) IN164	igual a OG100 pero <i>recJ::Tn10</i> ***	Este trabajo
10) IN237	igual a PQ30 pero <i>recO::Tn5</i> ***	Este trabajo

* Los 4 puntos (::) indican presencia de transposones (Tn10 o Tn5) de bacteriófagos.

** *sulA::Mud(AplacZ)*: Fusión de *lacZ* a *sulI* por medio del bacteriófago *Mud* el cual lleva la información para conferir resistencia a ampicilina.

*** Fusión del gen *recO*, *recJ* por transposones Tn10 o Tn5.

uvrA, *oxyR*, *recN*, *recB*, *recJ* y *recO* son genes presuntamente implicados en mecanismos de recombinación, reparación o de protección del daño genético.

CONSTRUCCION DE CEPAS DEFECTUOSAS EN LOS GENES *recJ* y *recO*.

Para la construcción de las nuevas cepas se transfirieron genes de bacterias donantes a receptoras mediante el procedimiento de transducción general por bacteriófagos.

En *E. coli* se utilizó el fago P1 (Miller, 1972). Este es un fago lítico que tiene la particularidad de que aún cuando no lleve información genética propia sino únicamente aquélla de la bacteria en la que creció, no pierde su capacidad de infectar a otras células. Se forman así las llamadas partículas transducentes que al llevar ADN bacteriano comparten secuencias homólogas que pueden integrarse por recombinación, al genoma del hospedero bacteriano, transfiriéndose así caracteres de una línea celular a otra.

El método comenzó con la preparación de un lisado de fago P1 que crece en las bacteria a partir de las cuales se quiere obtener material genético para transferir.

PREPARACION DE LISADO DEL FAGO P1.

Se sembró la bacteria donadora en medio Luria-Bertani (líquido), se incubó durante 24 horas. Se tomó 0.6 ml de bacteria y 0.25 ml de una suspensión de fago P1 (preparado a partir de *E. coli* C600 a concentración de 4.0×10^9 (pfc)*) por ml. Se incubó por 15 minutos y se pasó la mezcla a un matraz de 125 ml, conteniendo 10 ml de LB líquido + 0.025 ml de KCl 0.05 M. Se incubó de 3 a 4 horas hasta que ocurra la lisis, es cuando el líquido se observa casi totalmente transparente.

Se agregó 0.1 a 0.2 ml de cloroformo y se incubó con agitación durante 10 minutos, se centrifugó a 10000 revoluciones por minuto (rpm) a 5° C durante 10 minutos, se colectó el sobrenadante con una pipeta y se colocó en tubo estéril con tapón de rosca, agregando una gota de cloroformo como conservador. Se determinó la concentración de fago por titulación en *E. coli* C600.

* Partículas formadoras de placa.

TITULACION DEL FAGO P1.

Se cultivó *E. coli* C600 en medio líquido LB, durante 24 horas y se prepararon cajas con medio LB sólido. Se prepararon tubos de ensayo con 2 ml de medio SM para hacer diluciones a concentraciones 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} . Posteriormente se agregó 0.1 ml de bacteria C600 y 0.1 ml de las diluciones 1×10^{-6} , 1×10^{-7} , 1×10^{-8} y se colocaron en baño multi-block a 37°C . A c/u de los tubos se agregó 2.5 ml de agar de superficie (previamente licuado y a temperatura de 45°C), agitando perfectamente y se vació todo en las cajas con medio LB (sólido). Una vez que gelificó se incubaron las cajas a 37°C , durante 24 horas y posteriormente se realizó el conteo de placas de lisis para determinar la concentración de fago por ml.

TECNICA DE RECOMBINACION (TRANSDUCCION).

Se preparó un cultivo de la bacteria receptora con el antibiótico adecuado y se incubó durante 24 horas. Se prepararon cajas con medio sólido LB selectivo, conteniendo los antibióticos que seleccionan contra las bacterias donadoras y las receptoras. Se centrifugó el cultivo de 24 horas a 10000 rpm y a 5°C durante 10 minutos, se tomó el sobrenadante y se resuspendieron las bacterias en solución MC. Se incubó durante 15 minutos con agitación constante. Se mezclaron volúmenes iguales (0.7 ml) de bacteria y de fago a diluciones 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} y se incubó otros 5 minutos más. Se sembró 0.1 ml de esta mezcla en c/u de las cajas y se incubaron de 24 a 48 horas a 37°C . Se examinaron las cajas, se aislaron las colonias visibles, que son los presuntos transductantes, se sembraron en medio líquido y se incubaron por 24 hrs. Posteriormente se probó la presencia de los diferentes marcadores transducidos.

PRUEBA A LA RADIOSENSIBILIDAD U.V.

Se prepararon cajas de LB (sólido) y se marcaron con divisiones para cada bacteria y para cada dosis. Con un capilar se tomaron alícuotas de los cultivos de presuntos transductantes, se sembraron a lo largo de la marca en las cajas y se secaron por aproximadamente 20 minutos. Se irradiaron con luz ultravioleta a las dosis señaladas. Una vez expuestas se guardaron en cajas de cartón para evitar el paso de la luz visible y se incubaron durante 24 horas. Todo este proceso se efectuó bajo luz roja. Se seleccionaron los transductantes con mayor zona de inhibición para utilizarse en las pruebas subsiguientes.

PRUEBA DE SENSIBILIDAD CON MITOMICINA C.

La mitomicina C es un agente químico radionimético, es decir, produce daños similares a los de la radiación. Se prepararon cajas de LB (sólido) sin antibiótico y se marcaron las cajas con 4 divisiones (cada división corresponde a una bacteria). A las cajas se agregó, por medio de un capilar, mitomicina C (MMC) a 200 µg/ml, en forma transversal a donde van los cultivos de bacterias y buffer de fosfato 0.01 M como testigo. Se dejaron secar en la incubadora durante 20 minutos. Al igual que en el caso anterior, se tomaron alícuotas de los cultivos, se sembraron a lo largo de la marca en la caja. Se secaron durante 20 minutos y posteriormente fueron incubados durante 24 horas a 37° C. Los transductantes con mayor zona de inhibición son los que se utilizaron en las siguientes pruebas ya que esto es indicio de mayor sensibilidad a la radiación.

OBTENCION DE COLONIAS AISLADAS.

Se prepararon cajas con LB sólido y los antibióticos adecuados y tubos con 2 ml de buffer de fosfato (0.01 M). Se prepararon diluciones 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , a partir del cultivo usado para las pruebas con UV y MMC. Se sembró 0.1 ml de la dilución menos concentrada, en cajas con LB sólido y se incubó durante 24 horas.

ENSAYO DE MARCADOR DE FOSFATASA ALCALINA.

En una caja petri se puso un volumen pequeño de solución de PNPP que es el sustrato de la fosfatasa alcalina y a continuación se colocó un disco de papel filtro para humedecerlo con esta solución. Se tomó el disco y se pasó a una de las cajas incubadas 24 horas donde hay colonias aisladas. Transcurridos 5 minutos se examinó el papel y si aparece color amarillo en los sitios correspondientes a las colonias significa que el marcador *phoC* está presente en la bacteria.

ENSAYO CUALITATIVO DE B-GALACTOSIDASA.

Del mismo cultivo usado para todas las pruebas anteriores se tomó 0.08 ml de bacteria, se agregó a 4 ml de LB líquido y se incubó a 37° C con agitación constante hasta alcanzar la fase de crecimiento logarítmico medio (aproximadamente a las 2 horas). Cuando esto ocurre la lectura en el espectrofotómetro a 600 nm es de 0.5. Mientras tanto se prepararon 4 tubos con 1 ml de bacteria cada uno de la siguiente manera : 1) bacteria sola, 2) bacteria + 2 % de lactosa, 3) bacteria + 0.01 ml de mitomicina a 2.7 mg/ml, 4) bacteria + lactosa (2 %) + 0.01 ml de mitomicina (2.7 mg/ml). Se incubó con agitación constante 24 horas y a continuación se agregó indicador de azul de bromotimol. Si el patrón de coloración concuerda con lo indicado en la Tabla 2 significa que el marcador *lacZ* está asociado al sistema SOS.

TABLA 2				
CEPAS	BAC.	BAC. + LA	BAC. + MMC.	BAC+ LAC+MCC
OG100	AZUL	AZUL	AZUL	AMARILLO
IN164	AZUL	AZUL	AZUL	AMARILLO
IN237	AZUL	AZUL	AZUL	AMARILLO
RDK1541	AZUL	AZUL	AZUL	AZUL.

BAC. = Bacteria. BAC. + LAC. = Bacteria + Lactosa. BAC. + MMC. = Bacteria + Mitomicina. BAC. + LAC. + MMC. = Bacteria + Lactosa + Bacteria.

ENSAYO DE SENSIBILIDAD AL EFECTO LETAL DE LA RADIACION IONIZANTE.

Se preparó un cultivo líquido de 24 horas con los correspondientes antibióticos, cajas con LB (sólido), tubos de ensayo con fosfato 0.01 M y se colocaron en refrigeración. Se centrifugaron las bacterias a 10000 rpm a 5° C durante 10 minutos, se tiró el sobrenadante, se agregó un volumen igual de fosfato 0.01 M y se resuspendió el botón de bacterias. Se prepararon tubos de vidrio con tapón de baquelita (0.5 X 10 cm) y se marcaron para indicar las diferentes dosis de radiación. Se agregó a cada tubo 2 ml de suspensión de bacterias. Se irradiaron las bacterias a diferentes dosis de radiación gamma, utilizando una fuente de cobalto 60 (los tiempos de irradiación se calcularon en función de la razón de dosis de la fuente) en Gy / min. Se efectuaron las diluciones de los cultivos irradiados 1×10^{-2} , 1×10^{-4} , 1×10^{-6} , para cada uno de los tratamientos y según la dosis se sembró 0.1 ml de cada dilución en las cajas con L.B. Se incubaron durante 24 horas y se contaron las colonias sobrevivientes. El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo dividiendo el resultado de las muestras tratadas entre el del testigo sin radiación.

ENSAYO DE SENSIBILIDAD AL EFECTO LETAL DE LA RADIACION ULTRAVIOLETA

Se sembraron bacterias en LB líquido durante 24 horas y se prepararon cajas con LB (sólido). Se tomaron 0.3 ml de bacteria y se colocaron en un matraz de 125 ml conteniendo 12 ml de LB líquido. Se incubaron con agitación constante hasta alcanzar la fase logarítmica media ($A_{600} = 0.5$). Se prepararon tubos de ensayo con 2 ml de PO_4 0.01 M para las 4 diluciones. Se centrifugaron las bacterias a 10000 rpm a 5° C durante 10 minutos y se tiró el sobrenadante. Se agregó un volumen igual de PO_4 0.01 M y se resuspendió por medio del agitador Vortex. A partir de este momento todo se realizó bajo luz infrarroja. Se tomaron 1.5 ml de bacteria y se colocaron en cajas petri de 5 cm de diámetro (una por dosis). Se irradiaron las cajas con luz ultravioleta con agitación rotatoria y se efectuaron las respectivas diluciones, según la dosis se sembró 0.1 ml de bacteria en las cajas con medio de Luria sólido. Una vez sembradas se guardaron en cajas de cartón para evitar el paso de la luz visible, se incubaron durante 24 horas y se contaron las colonias sobrevivientes. El porcentaje de sobrevivencia se obtuvo dividiendo el resultado de las muestras tratadas entre el del testigo sin radiación.

CROMOENSAYO (INDUCCION DE SOS POR RADIACION GAMA)

A partir de un cultivo líquido de 24 horas se sembró 0.3 ml de bacteria en un matraz de 125 ml conteniendo 12 ml de LB líquido. Se incubó con agitación constante hasta alcanzar la fase logarítmica media ($A_{600} = 0.5$). Se centrifugaron las bacterias a 10000 rpm a 5° C durante 10 minutos, se tiró el sobrenadante y se agregó un volumen igual de fosfato 0.01 M para resuspender el botón de bacterias. Se prepararon tubos con tapón de baquelita (0.5 X 10 cm) y se marcaron para indicar las diferentes dosis de radiación. A cada tubo se agregó 2 ml de suspensión de bacterias. Se irradiaron las bacterias a diferentes dosis de radiación gama, utilizando la fuente de cobalto 60 (los tiempos de irradiación son en función de la razón de dosis de la fuente). Se tomó una muestra de bacterias irradiadas y se diluyó 1:10 en medio LB líquido, se incubó 2 horas a 37° C. En tubos de ensayo con 2.5 ml de buffer específico para cada enzima, 0.5 ml de sustrato específico para cada enzima (para β -galactosidasa es ONPG y para fosfatasa alcalina. PNP) se colocaron 0.3 ml de bacteria. Se incubó todo a 37° C hasta que apareció el color amarillo en el medio y se midió la absorbancia a 420 nm. (El tiempo es variable, según los requerimientos del experimento) La relación entre las actividades de β -galactosidasa y fosfatasa alcalina se expresa en el factor R, que indica el grado de estimulación del sistema SOS; de acuerdo a la siguiente fórmula :

$$FR = \frac{\text{Abs } 420 \beta \text{ gal.} \times t. \text{ Fa.}}{\text{Abs } 420 \text{ Fa.} \times t. \beta \text{ gal.}}$$

En donde : Abs 420 β gal. = Absorbancia a 420 nm por acción de la enzima β -galactosidasa sobre el sustrato. Abs 420 Fa. = Absorbancia a 420 nm por acción de la enzima fosfatasa alcalina sobre el sustrato. t. β gal. = Tiempo de aparición del color amarillo de la enzima β -galactosidasa. t. Fa. = Tiempo de aparición del color amarillo de la enzima fosfatasa alcalina.

El cociente entre el factor R de la muestra tratada y el del testigo sin tratamiento representa el factor de inducción (FI) y graficando dosis contra FI se obtiene la curva de dosis-respuesta.

Utilizando la metodología anterior se realizó la cinética enzimática para determinar el tiempo de incubación postirradiación más adecuado para lograr el máximo de inducción de las funciones SOS. Se realizaron éstos utilizando una sola dosis de radiación y diferentes tiempos de incubación.

Los medios utilizados en la metodología así como su elaboración se muestran en el apéndice.

8) RESULTADOS.

En la figura 12 se observa la respuesta de los transductantes construidos, IN237 *recO* e IN164 *recJ. oxyR* al efecto letal de la radiación gama en comparación con la de las cepa progenitoras y otras más ya probadas anteriormente. De acuerdo a la teoría del blanco (Casarett, 1968) la cual postula que cuando el número de golpes o eventos de radiación equivale al de blancos (células, ADN, etc.) $e^{-1} = 0,37$ o DL₃₇ (dosis letal), que en la curva es el 37% de sobrevivencia, se observa que la cepa PQ30 es la más resistente con una DL₃₇ de 350 Gy, seguida de OG100 con una DL₃₇ de 190 Gy e IN28 de 140 Gy. En las demás cepas, incluyendo a los nuevos transductantes las DL₃₇ están por debajo de los 140 Gy, siguiendo RDK1450 120 Gy, RDK1541 110 Gy, IN164 100 Gy e IN237 60 Gy y finalmente con la DL₃₇ más baja de sólo Gy para IN99 (tabla No.3).

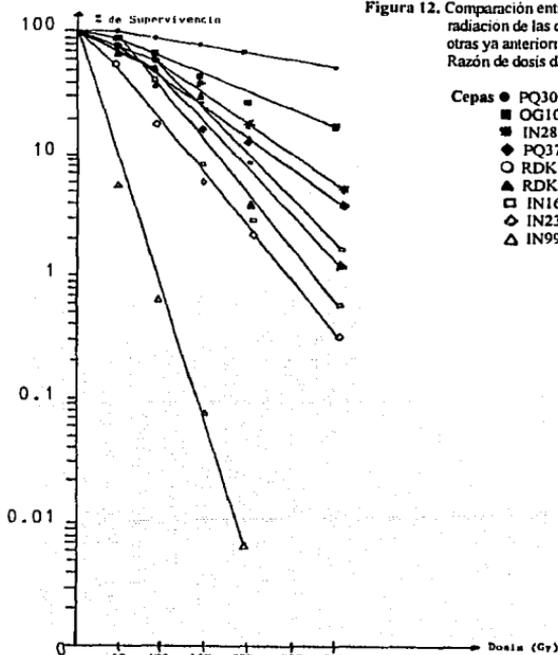


Tabla No. 3 DL₃₇ en cepas con deficiencias en diversos genes.
 PQ37 (*uvrA*), OG100 (*oxyR*), IN28 (*oxyR, recN*), IN99 (*oxyR, recB*), IN164 (*recJ*), IN237 (*oxyR, recO*) y PQ30 (*wt*).

CEPA	GENES	DL ₃₇ (Gy)
PQ30	<i>wt</i>	350
PQ37	<i>uvrA</i>	120
OG100	<i>oxyR</i>	190
IN99	<i>oxyR, recB</i>	20
IN28	<i>oxyR, recN</i>	140
IN164	<i>oxyR, recJ</i>	60
IN237	<i>recO</i>	50
RDK154 I	<i>recO</i>	110
RDK1450	<i>recJ</i>	120

Una vez obtenidos los datos de sobrevivencia se procedió a efectuar experimentos de cinética enzimática. Se observa que en IN164 el máximo de inducción SOS se alcanza a los 60 minutos, mientras que en la cepa IN237 este máximo se da a los 75 minutos (figura 13 a.), el tiempo de IN164 concuerda con los testigos IN28, OG100 y PQ30, pero no con PQ37 y con respecto a IN237, ésta no concuerda con ninguno de los testigos (figura 13).

Una vez determinado el tiempo óptimo de incubación postirradiación, se efectuaron irradiaciones a 2 razones de dosis: alta (10.5 Gy/min) y baja (3.6 Gy/min), la tabla No. 6 muestra los tiempos de irradiación para las dos razones de dosis. Los resultados a razón de dosis alta indican que en el intervalo de 4 a 128 Gy, tanto en la cepa IN164 como IN237 hay bajos valores de inducción SOS en comparación con las demás. Estos aumentan a partir de los 250 Gy, hasta alcanzar un factor de inducción de 27.6 a 1000 Gy en IN164 y 22.8 en IN237 (figura 14, tabla No.4). El comportamiento es similar a razón de dosis baja (figura 15, tabla No.5) y en ambos casos se observa que ambas cepas a prueba son poco inducibles y que la razón de dosis no influye en la respuesta.

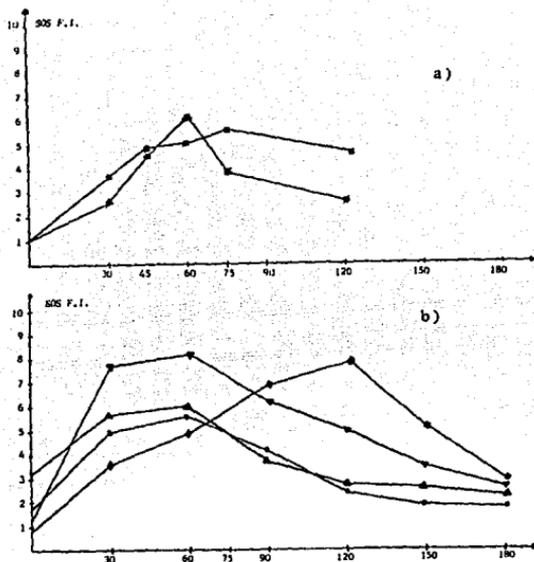


Figura 13. Factor de inducción de SOS en función del tiempo de incubación postirradiación a 250 Gy, a razón de dosis de 10.5 Gy/min. a) Cepas construidas ■ IN237, ● IN164. b) Cepas testigo ◆ PQ37, ▼ IN28, ▲ OG100, ● PQ30

Tabla No. 4 Valores de inducción SOS a razón de dosis alta (10.5 Gy/min).								
DOSIS (Gy)	F.R. IN164		F.I. SOS IN164		F.R. IN237		F.I. SOS IN237	
	X	n	X	n	X	n	X	n
0	0.10	0.02	1	0	0.10	0.01	1	0
4	0.23	0.07	2.3	0.28	0.21	0.04	2.1	0.10
8	0.27	0.02	2.7	0.66	0.24	0.02	2.4	0.03
16	0.31	0.05	3.1	0.61	0.26	0.02	2.6	0.06
32	0.35	0.09	3.5	0.25	0.27	0.27	2.7	0.16
64	0.38	0.11	3.8	0.23	0.34	0.32	3.4	0.24
128	0.41	0.18	4.1	0.30	0.49	0.32	4.9	0.33
250	0.65	0.20	6.5	0.32	0.52	0.34	5.2	0.34
500	1.64	0.21	16.4	0.31	1.33	0.35	13.3	0.36
1000	2.76	0.23	27.6	0.34	2.28	0.36	22.8	0.37

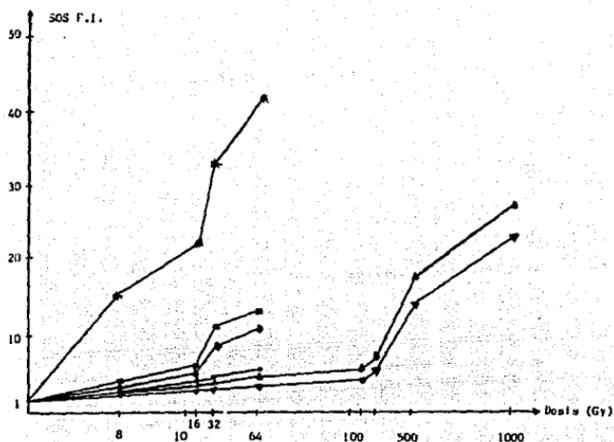


Figura 14. Inducción de las funciones SOS a razón de dosis alta (10.5 Gy/min).
Cepas construidas ▼ IN237, ▲ IN164. Cepas testigo * IN28, ■ OG100, ◆ PQ37, ● PQ30.

Tabla No. 5 Valores de inducción de SOS a razón de dosis (3,6 Gy/min).								
DOSIS (Gy)	F.R. IN164		F.I. SOS IN164		F.R. IN237		F.I. SOS IN237	
	X	n	X	n	X	n	X	n
0	0.24	0.05	1	0	0.25	0.03	1	0
2	0.33	0.14	1.4	0.26	0.27	0.04	1.1	0.06
4	0.40	0.12	1.7	0.15	0.37	0.06	1.5	0.15
8	0.48	0.17	2.0	0.23	0.39	0.05	1.6	0.23
16	0.51	0.18	2.1	0.26	0.61	0.11	2.0	0.20
32	0.68	0.02	2.2	0.1	0.77	0.01	2.1	0.05
64	0.83	0.01	2.5	0.05	0.83	0.01	2.3	0.04
128	0.88	0	2.6	0.06	0.85	0.005	2.4	0
250	0.92	0.01	2.8	0	0.89	0.005	2.6	0.11
500	1.73	0.007	7.2	0.3	1.67	0.007	6.7	0.3
1000	1.93	0.007	8.1	0.4	1.84	0.007	7.4	0.2

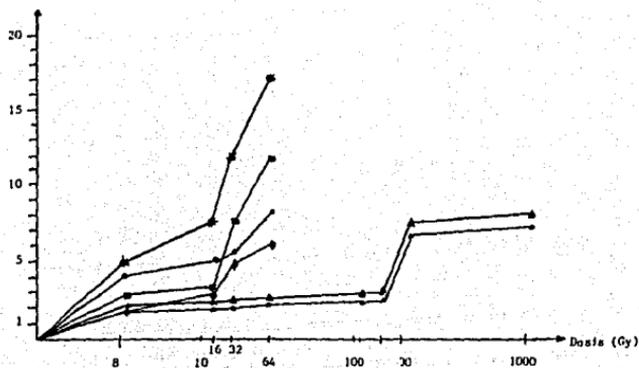


Figura 15. Inducción de las funciones SOS a razón de dosis baja (3.6 Gy/min).
Cepas construidas ▲ IN164, ○ IN237. Cepas testigo ✱ IN28, ■ OG100, ● PQ37, ◆ PQ30.

Tabla No. 6 Tiempos de irradiación a razones de dosis alta y baja. Fuentes de Co^{60} (Gamma-cell) y (Vick-rad)			
DOSIS (Gy)	VICK-RAD DOSIS BAJA	GAMMA-CELL ALTA	DOSIS
2	0 : 00 : 35	0 : 00 : 14	
4	0 : 01 : 10	0 : 00 : 28	
8	0 : 02 : 20	0 : 00 : 56	
16	0 : 04 : 40	0 : 01 : 52	
32	0 : 09 : 20	0 : 03 : 04	
34	0 : 18 : 40	0 : 06 : 08	
128	0 : 37 : 20	0 : 12 : 16	
250	1 : 14 : 40	0 : 24 : 15	
500	2 : 29 : 20	0 : 48 : 30	
1000	4 : 58 : 40	1 : 37 : 00	

En la metodología original (Quillardet y Hofnung, 1985) se establece que el potencial de inducción SOS (Pisos) es la pendiente de la curva en un intervalo de dosis determinado e indica el grado de genotoxicidad de un agente. En el caso de este trabajo, el Pisos indica la radiosensibilidad de la cepa en función de las distintas deficiencias de reparación. Los potenciales de inducción a 8 Gy indican que la cepa más inducible es la IN28 y en orden creciente OG100, PQ37, IN99, IN164, IN237, hasta PQ30 (tabla No.7).

Tabla No. 7 Comparación entre el potencial de inducción SOS (Pisos) y la dosis mínima de doblaje (DMD) a dos dosis y dos razones de dosis en diferentes cepas.						
RDA (Razón de dosis alta)			RDB (Razón de dosis baja)			
CEPA	Pisos 8 Gy RDA	Pisos 64 Gy RDA	Pisos 8 Gy RDB	Pisos 64 Gy RDA	DMD SOS RDA	DMD SOS RDB
PQ30	0.18	0.078	0.18	0.090	16	9
PQ37	0.31	0.16	0.48	0.125	5	7
OG100	0.50	0.20	0.30	0.18	5	6
IN28	1.87	0.64	0.62	0.25	1	1
IN164	0.25	0.039	0.33	0.059	4	8
IN237	0.20	0.035	0.30	0.053	4	9
IN99	0.25	0.10	-----	-----	9	---

9) DISCUSION

LETALIDAD : Al comparar la supervivencia a la radiación entre las cepas construidas y otras ya probadas, en función de las deficiencias en los sistemas de reparación o protección defectuosos, se observa que la sensibilidad expresada en DL_{37} es : $PQ30 (wt) > OG100 (oxyR) > IN28 (oxyR,recN) > PQ37 (uvrA) > IN164 (oxyR,recJ) > IN237 (recO) > IN99 (oxyR,recB)$.

De acuerdo a estos datos se nota que los genes *uvrA* y *oxyR* no participan en forma importante en la reparación de las rupturas dobles, principales responsables de la muerte celular. Esto confirma lo ya reportado para *uvrA*, que es un gen que repara los daños por luz UV y otros agentes químicos pero no las rupturas dobles producidas por radiación ionizante (Sargentini y Smith, 1986). Sin embargo, *PQ37* no es tan resistente como *PQ30* por lo cual el gen *uvrA* debe tener participación en la reparación de otro tipo de daños en las bases o en los nucleótidos (Hurts y Nasim, 1984).

En seguida se observa que con excepción de *recN* cuyos efectos ya se discutieron en otro trabajo (Serment, 1992) los demás genes *rec* tienen una importancia creciente. De acuerdo a diversos autores (Thoms, 1988; Lloyd, 1988; 1991; Clark, 1991; Lovett y Kolodner, 1991; Haggert y Lovett, 1993; Asai, 1994; Luisi-Deluca y Kolodner, 1994 y Sawitzke, 1994) la reparación de las rupturas dobles requiere de la participación de *recA*, *recB*, *recN* y los más importantes son *recA* y *recB*, lo que se confirma para este último en la figura 12. Sin embargo el echo de que las cepas *recO* y *recJ* sean más sensibles indica una posible participación.

El gen *oxyR*, que regula la transcripción de proteínas relacionadas con la eliminación de radicales oxidantes como el $OH\cdot$ y otros, tiene un papel importante en la respuesta celular al efecto indirecto de la radiación (Lafleur y Retel, 1993). Sin embargo como hay cierta transcripción basal de todos estos genes, la deficiencia de *oxyR* no llega a ser de gran relevancia en la supervivencia al daño por radiación ionizante (figura 12).

La cinética de inducción de SOS alcanza el máximo a los 60 minutos en *IN164 (recJ)* y a los 75 minutos en *IN237 (recO)*. La primera concuerda con lo obtenido por Serment (1992) en donde este es similar al de *PQ30 (wt)*, *OG100 (oxyR)* e *IN28 (recN)*. *PQ37* y *IN237* son más lentas, lo que indica que *uvrA* y *recO* posiblemente participen, al menos parcialmente, en el proceso de inducción SOS que de acuerdo a Walker (1987) se inicia a partir de la presencia en el ADN de regiones de una sola banda.

Se utilizaron 2 razones de dosis para determinar hasta qué punto los genes defectuosos influyen en la reparación de las lesiones o en la señal de inducción SOS. En trabajos anteriores se observó que a razones de dosis bajas, una vez activado SOS, había un intervalo en el que aunque la dosis aumentara, el nivel SOS se mantenía estable, indicando que no había incremento del daño. Se pensó entonces que esto podía deberse a un mecanismo que reparaba las lesiones a medida que se producían y cuyo efecto se manifestaba a tiempos largos de irradiación.

Tanto a la razón de dosis baja como a la alta, se nota que en el intervalo que va de 0 a 10 Gy, PQ30 (*w*) y las dos cepas construidas presentan poca inducción, que apenas rebasa el mínimo significativo de 2. Esta tendencia continúa en aquéllas, pero no en PQ30, hasta los 250 Gy en donde nuevamente aumenta. Aun cuando hay cierto grado de activación SOS ya desde los 8 Gy, el hecho de que ésta no aumente con la dosis, podría atribuirse a las deficiencias de *recJ* y de *recO*. *RecJ* posee actividad de exonucleasa 5'--->3' específicamente sobre moléculas lineares de ADN, dando lugar a fragmentos largos de una sola banda (Sargentini y Smith, 1986). Otros autores (Wang, 1988; Tseng, 1994) le atribuyen una función complementaria con RecBCD, contribuyendo al desplazamiento y degradación de una de las bandas de ADN proporcionando así el sustrato adecuado para RecA. En cambio *recO* es un promotor eficiente de la recombinación (Lloyd et al, 1987), además de fomentar la renaturalización complementaria de ADN y contrarrestar la afinidad de la proteína SSB (single-strand binding) por el ADN de una banda (Umezú et al, 1993). De acuerdo a lo anterior es posible que ambos participen en la integración de la señal de iniciación de la respuesta SOS ya que las rupturas dobles no son inductores directos de ésta. Para explicar esta hipótesis se propone el siguiente modelo tentativo. (Figura 16.)

Al haber en el ADN daños que se traducen en la aparición de regiones de una banda, se produce una señal que provoca un cambio en la proteína RecA agregando a sus funciones normales de recombinasa, las de proteasa, que destruye así al represor LexA, para iniciar la transcripción de los genes SOS. No obstante las rupturas dobles deben ser previamente procesadas para provocar el cambio en *recA*. Este procesamiento se efectúa por la acción exonucleolítica de *recB* junto con *recJ* que produciría regiones de una banda. *In vitro* se ha demostrado que RecA se activa ante ADN de una banda, que es al parecer la señal de inducción (Craig y Roberts, 1981; Walker, 1984). La proteína SSB tiene gran afinidad por ADN tanto de doble como de banda sencilla (Luisi-DeLuca y Kolodner, 1994; Sandler, 1994; Sandler y Clark, 1994) lo que en cierta forma impide que RecA se adhiera al ADN para activarse y poder así iniciar las funciones SOS (Peterson y Mount, 1993). Se supone entonces que RecO junto con RecA desplazaría a SSB, para que aquella se una al ADN de una banda, y se active como proteasa. Al no estar presente el gen *recO*, no podrá colaborar en el desplazamiento de la proteína SSB, y por consiguiente los niveles de SOS serán más bajos con respecto a los de las demás cepas. En lo que respecta a la inducción SOS inicial, que se observa a dosis relativamente bajas, probablemente se debe a rupturas sencillas del ADN ocasionadas por la producción de la radiólisis del agua.

Así el modelo propuesto en este trabajo para la inducción de SOS, concordaría con la hipótesis propuesta por Umezú (1993); Sandler, Umezú y Kolodner (1994); Hegde *et al* (1995) y Whitby y Lloyd (1995) para recombinación, donde se propone que RecJ y RecBCD proporcionan el sustrato para RecA y que RecO junto con RecR y RecF participen en el desplazamiento de SSB. Las deficiencias en cualquiera de estos dos genes se manifestarían en una baja inducción de las funciones SOS (figura 14 y 15) y posiblemente menores niveles de recombinación.

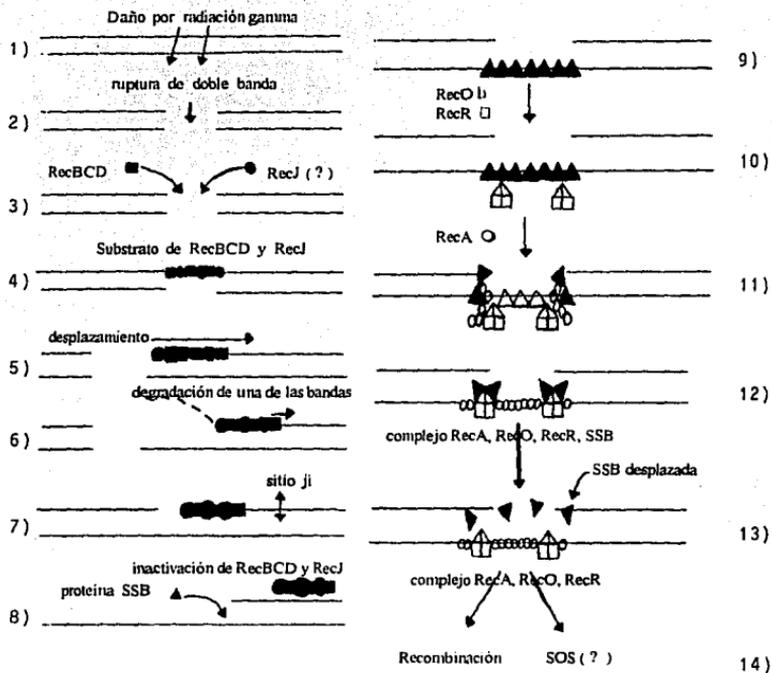


Figura 16. Modelo basado en la propuesta de Umezu y Kolodner (1994) para recombinación y reparación por recombinación. 1) Daño en el ADN por radiación gamma, 2) ruptura de doble banda en el ADN, 3) y 4) RecBCD y RecJ se adhieren a una de las rupturas, 5) ambos se desplazan, 6) en el desplazamiento van degradando nucleótidos, 7) al llegar al sitio λ se inactiva. 8) la proteína SSB se adhiere al ADN de una banda, 9) y 10) RecO y RecR se incorporan al ADN de una banda 11) se incorpora a SSB, desplazándola y permitiendo la entrada de RecA. 12) se forma un complejo RecA, RecO, RecR, SSB, 13) el complejo RecA, RecO, RecR, desplaza totalmente a SSB y 14) se produce la señal para recombinación o SOS (?) falta comprobarse experimentalmente.

10) CONCLUSIONES.

1.- Se construyeron mutantes de *E. coli* con defectos en los genes de recombinación y reparación *recO* y *recJ*, y de protección contra los daños por oxidación (*oxyR*) cuya sensibilidad a la radiación ionizante es mayor que la de la cepa silvestre.

2.- La deficiencia en el gen *oxyR* parece tener poca participación en la supervivencia a la radiación gamma.

3.- Los bajos niveles de inducción SOS en las cepas construidas se deben a la deficiencia en los genes *recO* y *recJ*.

4.- Se propone un modelo que plantea la participación conjunta de los genes *recJ*, *recO* y otros genes (*recA*, *recB*) en el mecanismo de inducción SOS por dosis altas de radiación ionizante.

5.- La inducción SOS a dosis bajas es resultado de rupturas sencillas en el ADN que no requieren de la participación de *recO* y *recJ* para que ocurra dicha inducción.

11) BIBLIOGRAFIA.

- 1) ALLAN, J. M. y Garner, R. C. (1994) The use of purified DNA repair proteins to detect DNA damage. *Mutation Research*. 313:165-174.
- 2) ASAI, T.; Sommer, S.; Bailone, A. y Kogoma, T. (1993). Homologous recombination from DNA damage-inducible origins in *Escherichia coli*. *The EMBO Journal*. 12:3287-3295.
- 3) ASAI, T. y Kogoma, T. (1994). The *recF* pathway of homologous recombinations can mediate the initiation of DNA damage-inducible replication of the *Escherichia coli* chromosome. *Journal of Bacteriology*. 176:7113-7114.
- 4) BREÑA, M. (1989). Inducción de las funciones SOS por radiación gamma. Informe técnico-científico Radiobiol. 07/89 ININ.
- 5) BREÑA, M. y Serment, J. (1991). Inducción por radiación gama de las funciones SOS en cepas de *E. coli* con diferentes capacidades de reparación. 2o Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Genética celebrado en Septiembre de 1991 en Saltillo, Coahuila, México.
- 7) BREÑA, M. y Serment, J. (1992). Influence of some repair genes on the SOS induction by low doses of ionizing radiation. 24th Annual Meeting of the European Society y Radiation Biology. Oct. 4-8, Erfurt, Germany.
- 8) CASARETT, A. P. (1968). Radiation Biology. Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs. New Jersey pp. 368.
- 9) CLARK, A. J. (1991). Rec genes and homologous recombination proteins in *Escherichia coli*. *Biochimie* 73:523-532.
- 10) CHISTMAN, M. F.; Morgan, R. W.; Jacobson, F. S. y Ames B. N. (1985). Positive control of a regulon for defenses against oxidative stress and some heat-shock proteins in *Salmonella typhimurium*. *Cell*. 41:753-762.
- 11) CRAIG, N. L. y Roberts, J. W. (1981). Function of nucleoside triphosphate and polynucleotide in *E. coli* *recA* protein-directed cleavage of phage lambda repressor. *The Journal Biological Chemistry*. 256:8039-8044.
- 12) DEMPLE, B. (1991). Regulation of bacterial oxidative stress genes. *Annual Review of Genetics* 125:315-337.

- 13) DEVORIET, R. (1992). Les fonctions SOS ou comment les bactéries survivent aux lésions de leur ADN. *Annales de l'Institut Pasteur/ actualités*. 1: 11-20.
- 14) FRIEDBERG, E. C. (1985). DNA repair. W. H. Freeman, Nueva York. pp. 613.
- 15) GOERLICH, O.; Quillardet, P. y Hofnung, M. (1989). Induction of the SOS response by hydrogen peroxide in various *Escherichia coli* mutants with altered protection against oxidative DNA damage. *Journal of Bacteriology*. 171:6141- 6147.
- 16) HAGGERTY, J. T. y Lovett, T. S. (1993). Suppression of *recJ* mutation of *Escherichia coli* by mutation in translation initiation factor IF3. *Journal of Bacteriology*. 175:6118 - 6125.
- 17) HEGDE, S.; Sandler J. S.; Clark, A. J. y Madiraju M. V. V.S. (1995). RecO and recR mutation delay induction of the SOS response in *Escherichia coli*. *Molecular General Genetics* 246:254-258.
- 18) HOWARD-FLANDERS, P. (1981). Inducible repair of DNA. *Scientific American* 245:56-64.
- 19) HOWARD-FLANDERS, P.; West C. S. y Stasiak A. (1984). Role of RecA protein spiral filaments in genetic recombination. *Nature*. 309:215-220.
- 20) HURTS, A. y Nasim, A. (1984). Repairable lesions in microorganisms. Academic. Press Inc. Orlando Florida pp. 325..
- 21) KENYON, C. J. (1983) The bacterial response to DNA damage. *Trends Biochemical in Sciences*. 8:84-87.
- 22) KLUG, S. W. y CUMMINGS, M. R. (1991). Concepts of Genetics Macmillan Company, Publishing New york. pp. 2236.
- 23) KOZUBEK, S.; OGIEVETSKAYA, M. M.; KRASAVIN, E. A.; DRASIL, V. y SOSKA, J. (1990). Investigation of the SOS response of *Escherichia coli* after gamma-irradiation by means of the SOS chromotest. *Mutation Research*. 320:1-7.
- 24) KUSHNER, S. R. (1987). DNA repair. En : *Escherichia coli and Salmonella typhimurium Cellular and Molecular Biology*. Neidhardt, F.C.; Ingram, J. L.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Schaechter, M. y Umberger, H.E. Eds , Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. 2:1044-1053.
- 25) LAFLEUR, V. M. y RET, J. (1993). Contrasting effects of SH- compounds on oxidative DNA damage: repair and increase of damage. *Mutation Research*. 295:1-10.

- 26) LEHNINGER, A. (1980). Bioquímica. Omega, Barcelona, pp. 1117.
- 27) LITTLE, J. W. y MOUNT, D. W. (1982). The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell*. 29:4-22.
- 28) LLOYD, G. R.; PORTON, C. M. y BUCKMAN, C. (1988). Effect of *recF*, *recJ*, *recN*, *recO* and *riv* mutation on ultraviolet survival and genetic recombination in a *recD* strain of *Escherichia coli* K12. *Molecular General Genetics* 212:317-324.
- 29) LLOYD, G. R. y BUCKMAN, C. (1991). Overlapping functions of *recD*, *recJ*, and *recN* provide evidence of three epistatic groups of genes in *Escherichia coli* recombination and DNA repair. *Biochimie*. 73:313-320.
- 30) LOVETT, T. S. y KOLODNER, D. R. (1991). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli recJ* chromosomal region and construction of RecJ-overexpression plasmids. *Journal of Bacteriology*. 173:353-364.
- 31) LUISI-DeLUCA, C. y KOLODNER, R. (1994). Purification and characterization of the *Escherichia coli* RecO protein. Renaturation of complementary single-stranded DNA molecules catalyzed by the RecO protein. *Journal of Molecular Biology* 236:124-138.
- 32) MASAAKI, K.; HIROTADA, M. y TAKASHI, Y. (1994). Induction of heat shock proteins by abnormal proteins results from stabilization and not increased synthesis of β 32 in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 176:5648-5653.
- 33) MILLER, J. (1972). Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, Nueva York pp. 466
- 34) MODRICH, P. (1991). Mechanisms and biological effects of mismatch repair. *Annual Review of Genetics* 25:229-253.
- 35) MYLES, G. M. y SANCAR, A. (1989). DNA repair. *Chemical Research in Toxicology*. 2:197-226.
- 36) PATERSON, M. C. y GENTHER, N. E. (1984). Environmentally induced DNA lesions and their biological consequences. En *Repairable lesions in microorganismos*. Hurts, A. y Nasim, A. Eds. Academic Press, Inc. Orlando Florida. 1-56.
- 37) PARSELL, D. A. y LINDQUIST, S. (1993) The function of heat-shock proteins in stress tolerance: degradation and reactivation of damaged proteins. *Annual Review Genetics* 27:437-496

- 38) PETERSON, R. K. y MOUNT, W. D. (1993). Analysis of the genetic requirements for viability of *Escherichia coli* K12 DNA adenine methylase (*dam*) mutants. *Journal of Bacteriology*, 175:7505-7508.
- 39) QUILLARDET, P. y HOFNUNG, M. (1985). The SOS Chromotest, a colorimetric bacterial assay for genotoxins: procedures. *Mutation Research*, 147:65-78.
- 40) QUILLARDET, P.; FRELAT, G.; NGUYEN, V.D., y HOFNUNG, M. (1989). Detection of ionizing radiations with the SOS Chromotest, a bacterial short-term test for genotoxic agents. *Mutation Research*, 216:251-257.
- 41) RADMAN, M. (1975). The SOS repair hypothesis : Phenomenology of an inducible repair which is accompanied by mutagenesis. En : Molecular mechanisms for repair of DNA. Hanawalt, P.C. y Setlow, R.B. Eds. New York. 355-367.
- 42) SARGENTINI, J. N. y SMITH, C. K. (1986). Quantitation of the involvement of the *recA*, *recB*, *recC*, *recF*, *recJ*, *recN*, *lexA*, *radA*, *radB*, *uvrD*, and *umuC* genes in the repair of X-ray- induced DNA double-strand breaks in *Escherichia coli*. *Radiation Research*, 107:58-72
- 43) SANCAR, A. y SANCAR, G. (1988). DNA repair enzymes. *Annual Review of Biochemistry*, 57:29-67.
- 44) SANDLER, S. J. (1994). Studies on the mechanism of reduction of UV-inducible *sulA*p expression by *recF* overexpression in *Escherichia coli* K-12. *Molecular General Genetics* 245:741-749.
- 45) SANDLET, S.J. y CLARK A. J. (1994). RecOR suppression of *recF* mutants phenotypes in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*, 176(12):3661-3672.
- 46) SASSANFAR, M. y JEFFREY, W. R. (1990). Nature of the SOS- inducing signal in *Escherichia coli*. The involvement of DNA replication. *Journal of Molecular Biology* 212:79-96.
- 47) SAWITZKE, A. J. and STAHL, W. F. (1992). Phage λ has an analog of *Escherichia coli* *recO*, *recR* and *recF* genes. *Genetics*, 130:7-16.
- 48) SAWITZKE, A. J. and STAHL, W. F. (1994). The Phage λ orf gene encodes a trans-acting factor that suppresses *Escherichia coli* *recO*, *recR*, and *recF* mutations for recombination of but not of *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 176:6730-6737.
- 49) SERMENT, G. J. H. (1992). Inducción por radiación gama de las funciones SOS en cepas de *E. coli* con diferentes capacidades de reparación. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias, U.N.A.M. 50 pp.

- 50) STAHL, F. W. (1987). Genetic recombination. *Scientific American*. 256:52-63.
- 51) STORZ, G.; TARTAGLIA L. A. y AMES, B. N. (1990). Transcriptional regulator of oxydative stress-inducible genes: Direct activation by oxydation. *Science*. 248:189-194.
- 53) THOMS B. y WACKERNAGEL, W. (1988). Suppression of the UV-sensitive phenotype of *Escherichia coli* *recF* mutants by *recA(Srf)* and *recA(Tif)* mutations requires *recJ+*. *Journal of Bacteriology*. 170:3675-3681.
- 54) TSENG, Y. C.; HUNG, J. L. y WANG, T. C. (1994) Involvement of RecF pathway recombination genes in postreplication repair in UV-irradiated *Escherichia coli* cells. *Mutation Research*. 315:1-9.
- 55) UMEZU, K.; CHI, N. W. y KOLODNER, R. D. (1993). Biochemical interaction of the *Escherichia coli* RecF, RecO and RecR protein with RecA protein and single-stranded DNA binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90:3875-3879.
- 56) UMEZU, K. y KOLODNER, R. D. (1994). Protein interactions in genetic recombination in *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*. 269:30005-30013.
- 57) WALKER, G. C. (1987). The SOS response of *Escherichia coli*. En : *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C.; Ingram, J. L.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Schaechter, M. y Umbarger, H.E. Eds , Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. 2:1346-1357.
- 58) WANG T. C. y SMITH K. C. (1988). Different Effects of *recJ* and *recN* mutations on the postreplication repair of UV-DNA damage in *Escherichia coli* K-12. *Journal of Bacteriology*. 170:2555-2559.
- 59) WANG T. C.; CHANG H. Y. y HUNG J. L. (1993). Cosuppression of *recF*, *recR* and *recO* mutations by mutant *recA* alleles in *Escherichia coli* cells. *Mutation Research*. 294:157-166.
- 60) WEINSTOCK, M. G. (1987). General recombination in *Escherichia coli*. En: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* Cellular and Molecular Biology. Neidhardt, F.C.; Ingram, J. L.; Low, K. B.; Magasanik, B.; Schaechter, M. y Umbarger, H.E. Eds , Am. Soc. Microbiol. Washington, D.C. 2:1034-1043.
- 61) WEST, C. S. (1992). Enzymes and molecular mechanisms of genetic recombination. *Annual Review of Biochemistry* 61:603-640.

62) WHITBY, C. M. y LLOYD, R. G. (1995). Altered SOS induction associated with mutation in *recF*, *recO* and *recR*. **Molecular General Genetics**. 246:174-179.

63) YURA, T.; NAGAI, H., y MORI, H. (1993). Regulation of the heat-shock response in bacteria. **Annual Review of Microbiology** 47:321-350.

APENDICE

REACTIVOS :

- Mitomicina C.

- ONPG (O-nitrofenil galactopiranososa) 4 mg/ml.

ONPG	400 mg.
Na ₂ HPO ₄ (0.1 M)	61 ml.
NaH ₂ PO ₄ (0.1 M)	39 ml.

- PNPP (p-nitrofenil fosfato) 4 mg/ml.

PNPP	400 mg.
Amortiguador P	100 ml.

MEDIOS SOLIDOS :

- Luria **

Peptona biotriptasa	10.0 g.
Extracto de levadura	5.0 g.
NaCl	10.0 g.
Agar bacteriológico	12.0 g.
Agua bidestilada	1000 ml.

- R-top-Agar**

Peptona biotriptasa	10.0 g.
Extracto de levadura	1.0 g.
NaCl	8.0 g.
Agar bacteriológico	8.0 g.
Agua bidestilada	1000 ml.

Después de esterilizar fue enriquecido con 2ml de CaCl₂ 1M y 5ml de glucosa al 20%.

MEDIOS LIQUIDOS :

- Luria**

Peptona biotriptasa	10.0 g.
Extracto de levadura	5.0 g.
NaCl	10.0 g.
Agua bidestilada	1000 ml.

- MC

MgSO ₄ 1M	1 ml.
CaCl ₂ 1M	0.05 ml.
Agua bidestilada	9 ml.

- SM**

NaCl	3.85 g.
Gelatina	0.5 g.
Agua bidestilada	480 ml.

Después de esterilizar fue enriquecido con 5ml de tris 1M pH 7.4 y 2 ml de MgSO₄.

- MgSO₄ 1M**

MgSO ₄ .7H ₂ O	61.62 g.
Agua bidestilada	250 ml.

- CaCl₂ 1M**

CaCl ₂	111.0 g.
Agua bidestilada	1000 ml.

- Tris 1M**

Trihidroximetilamino metano pH 7.4	121 g.
Agua bidestilada	1000 ml.

** Se esteriliza en autoclave durante 20 minutos a 120 C con 20 libras de presión.

- Amortiguador B (para β -galactosidasa).

Na_2HPO_4	16.1 g.
NaH_2PO_4	5.5 g.
KCl	0.75 g.
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.25 g.
SDS	1 g.
β -mercaptoetanol	2.7 ml.

Se ajusta a pH 7 y se afora a 1 litro.

- Amortiguador P (para fosfatasa alcalina).

Tris (hidroximetilamino metano) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$)	121 g.
SDS	1 g.

Se ajusta a pH 8.8 y se afora a 1 litro.